7. Rosendal, S. Comparative virulence of porcine Haemophyilus bacteria / S. Rosendal, D.A. Boyd, K.A. Gilbride // Can. J. Comp. Med. 1985. Vol. 49. P. 68-74.
8. Болезни свиней / В.А. Сидоркин, В.Г. Гавриш, А.В. Егунова, С.П. Убираев. М.: Аквариум-принт, 2007. С. 385-388.
9. Udeze, F.A. Role of Haemophilus pleuropneumoniae lipopolisacharide endotoxin in the pathogenesis of porcine Haemophilus pleuropneumonia / F.A. Udeze, K.S. Latimer, S. Kadis // J. Am Vet. Med. Assoc. 1987. Vol. 48, №. 5. P. 768-773.

УДК 619:579.843.96:615.371

Д.А. Бирюченков, В.С. Русалеев, А.П. Пономарев

ИНАКТИВАЦИЯ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

Введение

Actinobacillus pleuropneumoniae является возбудителем актинобациллезной плевропневмонии свиней – инфекционного контагиозного заболевания, характеризующегося септикотоксемией, геморрагической и гнойно-некротизирующей пневмонией, а также серозно-фибринозным плевритом, перикардитом и артритами. Заболевание распространено на территории РФ, что создает необходимость его специфической профилактики [7]. При создании инактивированных антибактериальных вакцин главной задачей является получение полноценного бактериального сырья, качество которого во многом зависит от используемого инактиванта.

Формальдегид – высокореактивное соединение, естественный метаболит клеток тканей человека и животных [8]. Препараты формальдегида широко используются на практике в виде 0,06-0,5% раствора как инактивант при производстве антибактериальных, противовирусных и иных иммунобиологических препаратов. Особый интерес для науки и практики представляют особенности механизма этого явления в отношении бактерий и вирусов [1, 10, 12]. Однако информация по использованию формальдегида для инактивации *A. pleuropneumoniae* скудна.

Общим признанием пользуется версия о том, что основное воздействие формальдегида распространяется на полинуклеотиды и аминогруппы белка. Аминогруппы NH_2- соединяются с одной или двумя молекулами формальдегида, а NH-группы только с одной, с образованием вначале лабильных метилольных производных, а затем стабильных метиленовых соединений. Реакции формальдегида с белками и нуклеиновой кислотой приводят к образованию стабильных межмолекулярных поперечных связей между аминокислотами и основанием одной или двух нуклеиновых кислот. Этот механизм сопровождается первичными повреждениями, деспирализацией и инактивацией нуклеиновых кислот, существенными конформационными изменениями полипептидной цепи, а также стабилизацией макроструктуры биополимеров. Одновременно ингибируется токсичность и стабилизируются антигенные и иммуногенные свойства биополимеров, что лежит в основе производства иммунобиологических препаратов. Полученные препараты, как правило, безвредны, сохраняют высокую антигенность и иммуногенность и стабильны при длительном хранении [1, 3, 10, 11, 12, 13].

Существует иное обоснование механизма взаимодействия формальдегида с ДНК бактерий. По мнению авторов, деградация нуклеиновых кислот происходит под действием монометилольных производных, которые образуются в результате взаимодействия пула свободных аминокислот с формальдегидом. Образующиеся соединения модифицируют основания ДНК в деспирализованных участках бактерий с потерей аденина и деградацией нуклеиновых кислот [2, 5].

Цель работы: изучить процесс инактивации бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae* формальдегидом и исследовать морфологию и ультраструктуру актинобацилл как основного сырья для изготовления вакцин.

Материалы и методы

В работе использовали два гетерологичных в серовариантном отношении штамма *A. pleuropneumoniae*, полученных из Американской коллекции типовых культур (№ 27088 и № 33377) и два гетерологичных в серовариантном отношении изолята бактерий *A. pleuropneumoni-*



Рис. 1. Штамм АТСС 27088
***A. pleuropneumoniae*, х 330001**

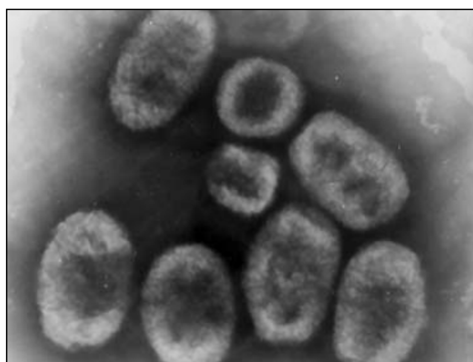


Рис. 2. Штамм АТСС 33377
***A. pleuropneumoniae*, х 33000**

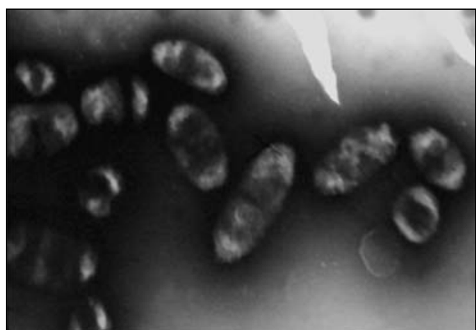


Рис. 3. Изолят «Ш-1»
***A. pleuropneumoniae*, х 33000**

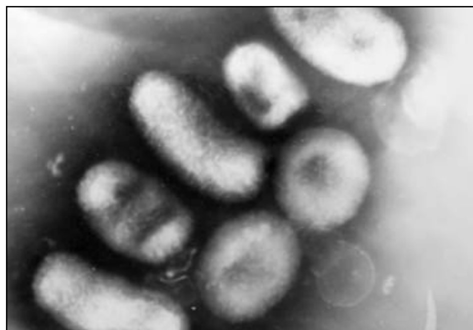


Рис. 4. Изолят «К-2»
***A. pleuropneumoniae*, х 36600**

ae «Ш-1» и «К-2».

Культивирование актинобацилл проводили глубинным способом в аппаратах АК-210 с использованием в качестве питательной среды бульона на основе перевара по Хоттингеру с добавлением специфических факторов роста.

Для работы использовали 39-40% водный раствор формальдегида (формалин). Инактивацию *A. pleuropneumoniae* проводили в культуральной среде, при 37° С в режиме постоянного перемешивания при 60 об./мин на УВМТ-12-250 (установка выращивания микроорганизмов термостатированная).

Концентрацию микробных клеток в суспензии определяли оптически (по стандарту мутности) и/или путем высева десятикратных разведений на плотные питательные среды и выражали в КОЕ. Расчет параметров инактивации производили по формуле экспоненты:

$$\frac{Xi}{Xo}=e^{-kt}, \text{ где}$$

k – константа скорости инактивации ($ч^{-1}$);
t – время инактивации (ч);
Xo – исходная концентрация ж. м. к. (lg КОЕ/$см^3$);
Xi – остаточное количество ж. м. к. (lg КОЕ/$см^3$)

Морфологию клеток *A. pleuropneumoniae* до и после инактивации изучали методом прямой электронной микроскопии с использованием общепринятой методики негативного контрастирования 4% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты рН 6,8 [6].

Результаты исследований

Нативные клетки бактерий *A. pleuropneumoniae* представляют собой мелкие грамотрицательные неподвижные палочки или коккобактерии, которые не образуют спор, имеют капсулу и обладают тропизмом к легочной ткани. Стабильная морфология бактериальных клеток наблюдается при культивировании с использованием в качестве питательной среды бульона на основе перевара по Хоттингеру с добавлением специфических факторов роста [7] (рис. 1 и 2).

Данные электронной микроскопии отражают гетерогенность популяции бактериальных клеток: наряду с эллипсовидными, вытянутыми вдоль большой оси (0,5-0,7х0,4 мкм) присутствуют клетки, близкие к шаровидной форме (0,5-0,4х0,4 мкм).

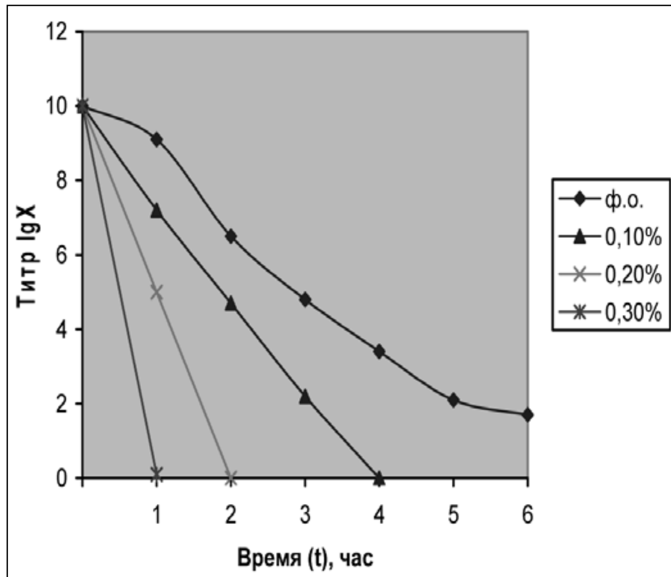


Рис. 5. Инактивация бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae* формалином

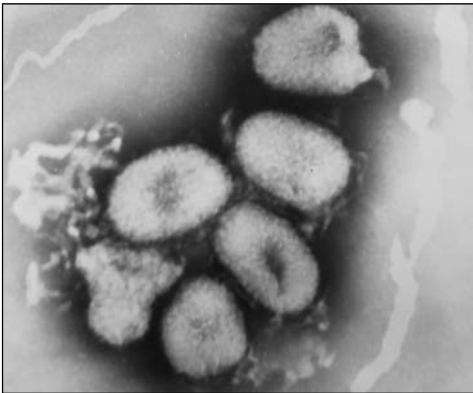


Рис. 6. Штамм АТСС 27088, после воздействия 0,4% формалина, х 36600

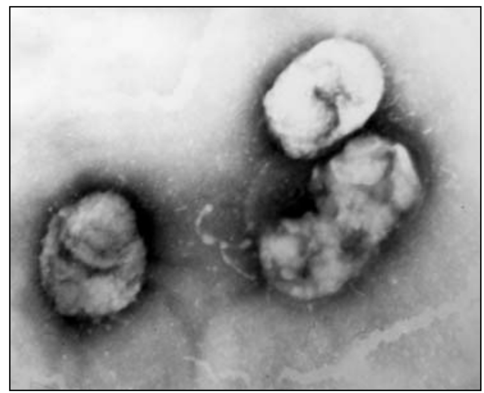


Рис. 7. Штамм АТСС 33377, после воздействия 0,4% формалина, х 36600

При изучении процесса инактивации формалин вносили в суспензию клеток актинобацилл в объеме 100 см^3 в количестве 0,1, 0,2 и 0,4% по объему. Концентрацию живых микробных клеток определяли до инактивации (Xo), а затем через 30 мин и 60 мин после внесения инактиванта (Xi).

На рис. 5 представлены кривые выживания бактерий *A. pleuropneumoniae* при внесении в бульонную культуру различных концентраций формалина, а также кривая естественной гибели бактерий в фазе отмирания (ф.о.).

Результаты исследований показывают, что указанные выше концентрации формалина обеспечивают процесс инактивации бактерий *A. pleuropneumoniae*, который идет с постоянной скоростью. При этом показатель константы скорости инактивации (k) составил для 0,1% формалина -0,49 ч$^{-1}$, для 0,2% -0,98 ч$^{-1}$, для 0,4% -1,86 ч$^{-1}$, с достоверностью $P<0,05$.

Увеличения объектов, указанные здесь и далее на рисунках актинобацилл, соответствуют исходным оригиналам фотографий, сделанных с помощью электронного микроскопа

Поскольку кривые выживания инактивируемых микроорганизмов линейны, полученные показатели k позволяют вести расчеты времени инактивации для получения тех или иных объемов антигена *A. pleuropneumoniae* с высокой степенью вероятности.

Как показано на рис. 5, увеличение концентрации формалина в 2 раза увеличива-

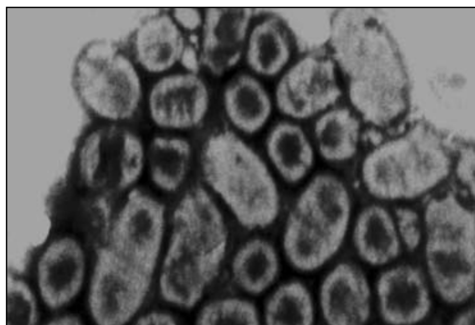


Рис. 8. Изолят «Ш-1», после воздействия 0,4% формалина, х 33000



Рис. 9. Изолят «К-2», после воздействия 0,4% формалина, х 36600

ло показатель k и, соответственно, сокращало время инактивации культуры (t) в аналогичное количество раз. В этом случае можно говорить о том, что процесс инактивации формалином является полностью прогнозируемым процессом.

С помощью электронной микроскопии изучались клетки, инактивированные формалином. Морфология и ультраструктура клеток *A. pleuropneumoniae* после воздействия 0,4% формалина представлена на рис. 6, 7, 8 и 9.

Проведенные нами исследования показали, что формальдегид имеет широкий спектр действия на бактерии *A. pleuropneumoniae*. Необходимо отметить, что морфология и ультраструктура актинобацилл после воздействия 0,1% формалина сохраняется лучше, чем таковая при 0,4%. Гетерогенность популяции бактериальных клеток после воздействия формальдегида сохраняется. Наряду с эллипсовидными клетками с размером по большой оси 0,8-1,0 мкм и по малой оси 0,4-0,5 мкм в популяции присутствуют клетки, по форме близкие к шаровидной с диаметром 0,4-0,5 мкм.

Электронно-микроскопические исследования выявили повреждения клеточной стенки, выход содержимого в виде извитых тяжей и полупрозрачных нитей в окружающую клетки среду. На месте разрушенных оставались «тени», т.е. погибшие, позитивно окрашенные полупрозрачные клетки бактерий после воздействия высокой дозы инактиванта. Отношение числа повреждений к общему количеству клеток в суспензиях, инактивированных 0,4% формалина, достигало 10%.

Выводы

Концентрация формалина в суспензии *A. pleuropneumoniae* 0,1-0,2% по объемному соотношению обеспечивает быструю инактивацию бактериальных клеток без существенного нарушения их морфологических параметров. Это позволяет получать качественные антигены для изготовления инактивированных вакцин.

РЕЗЮМЕ

В работе представлен материал по экспериментальному изучению воздействия формальдегида на клетки бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, инактивация которым позволяет получать качественное сырье для изготовления инактивированных вакцин. Низкие концентрации инактиванта в микробной суспензии обеспечивают быструю гибель бактерий без нанесения существенного ущерба морфологии клеток.

SUMMARY

Data on the experimental study of formaldehyde effect on *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria cells are given in the paper. The inactivation by formaldehyde allows production of high quality raw materials for manufacture of inactivated vaccines. Low concentrations of inactivant in microbial suspension provide quick death of bacteria without a significant damage to cell morphology.

Литература

1. Ласкавый, В.Н. Формальдегид: метаболизм, антибактериальные, терапевтические и иммуномодулирующие свойства / В.Н. Ласкавый, В.Т. Ночевный, Б.В. Виолин // Ветеринарная медицина и фармакология. Аграрная наука. 2005. №10. С. 21-25.
2. Калашников, Н.В. Особенности поражения бактерий формальдегидом / Н.В. Калашников // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1986. №6. С. 35-41.
3. Костина, Г.И. К вопросу о механизмах химической инактивации микроорганизмов / Г.И. Костина // ЖМЭИ. 1981. №8. С. 25-32.
4. Матвеев, В.Е. Научные основы микробиологической технологии: кинетика развития и инактивация микробных популяций / В.Е. Матвеев. М.: Агропромиздат, 1985. 224 с.
5. Семин, Ю.А. Взаимодействие формальдегида с нуклеотидами и ДНК в присутствии аминокислот и белков: Автореф. дисс… канд. биол. наук / Ю.А. Семин М., 1989. 39 с.
6. Пономарев, А.П. Атлас электронной микроско-

пии вирусов животных и некоторых условно-патогенных микроорганизмов / А.П. Пономарев, В.А. Мищенко. Владимир: Фолиант, 2005. 160 с.
7. Сидоров, М.А. Гемофилезы животных / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов. М.: Агропромиздат, 1986. С. 29-31.
8. Машковский, М.Д. Фармаколого-клинические аспекты учения об эндогенных физиологически активных соединениях / М.Д. Машковский // Клиническая медицина. 1990. №4. С. 3-15.
9. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. М., 1983. 560с.
10. Gomes, F. Ligia Formations of methyl radicals during the catalase-mediated oxidation of formaldegyde hydrazone / F. G. Ligia, A.Ohara // Carcinogenesis. Chort communication. 1991. Vol.12. P. 1351-1353.
11. Heck, A. H. Biochemical toxicology of formaldehyde / H. A. Heck, M. Casanova-Schmitz // J. Biol. Chem. 1983. Vol.1. P. 155-189.
12. Бушуева, Н.Б. Инактивация пастерелл и сальмонелл при изготовлении биопрепаратов / Н.Б. Бушуева, М.Я. Ярцев // Ветеринария. 1997. №11. С. 23-25.
13. Morozumi, T. Effect of temperature on the survival of Haemophilus parasuis in physiological saline / T. Morozumi, T. Hiramune // Natl. Inst. Anim. Health Q. 1982. Vol.22. P. 90-91.

УДК 619:616.98:579.843.94

А.В. Потехин, Ф.А. Ширяев, А.А. Рябоконь

ПАТОЛОГОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У СВИНЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОФИЛЕЗНОМ ПОЛИСЕРОЗИТЕ

Введение

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) – инфекционное заболевание свиней, характеризующееся септикотоксемией, серозно-фибринозным воспалением перикарда, плевры, брюшины, а также артритами и менингоэнцефалитом [2, 3, 6]. Заболевание вызывают бактерии семейства *Pasteurellaceae*, рода *Haemophilus*, вида *H. parasuis*. Гемофилезный полисерозит регистрируется во всех странах мира, в том числе и на территории России. Болезнь Глессера исторически рассматривали как спорадическую инфекцию поросят, связанную с воздействием на организм стрессовых факторов. В настоящее время инфекция представляет собой особую угрозу для крупных свиноводческих ферм и комплексов, потому что может распространяться как контагиозное заболевание с высокой смертностью, поражая свиней всех возрастов без очевидной связи с факторами стресса [1, 7]. Развитие данной ситуации определяется главным образом заносом в стадо одного или нескольких вирулентных штаммов возбудителя. Заболеваемость среди свиней на доращивании может достигать 75%, а смертность – 50%. К инфекции наиболее восприимчив молодняк в возрасте от 2 до 4 месяцев и особенно поросята через 2-3 недели после отъема [1, 7, 8].

Традиционно оценку патогенности возбудителя гемофилезного полисерозита проводят методом экспериментального заражения свиней. При этом тяжесть патоморфологических изменений и исход заболевания во многом зависят от вирулентности штамма, дозы и способа заражения. При интраназальной и интратрахеальной инокуляции бактерий патологические изменения обычно регистрируют только в легких, а воспаление брюшины выражено слабо или вообще отсутствует [4, 5]. Возбудитель обладает тропизмом к серозным оболочкам, в которых развиваются закономерные и наиболее тяжелые изменения в виде фибринозного воспаления. Развитие дистрофии в паренхиматозных органах и центральной нервной системе, а также расстройство гемодинамики у больных животных, являются результатом не столько непосредственного действия возбудителя, сколько проявлением реакции организма на бактериальный эндотоксин *H. parasuis*, а также продуктов распада, образующихся при воспалительных процессах. Тем не менее факторы патогенности возбудителя гемофилезного полисерозита, играющие первостепенную роль в генерализации инфекционного процесса, до конца еще не определены и требуют дальнейшего изучения [1, 6].

Целью данной работы было изучение патолого-морфологических изменений у свиней, зараженных различными дозами штамма *H. parasuis* «ИЛ-1».

Материалы и методы

В работе использовали штамм *H. parasuis* «ИЛ-1», выделенный из патологического материала (легкое, экссудат груд-